

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518-7554 print
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet8810
<http://nvlvet.com.ua>

UDC 616-091.8:616.36+616.127+616.61: 612.08:616.379-008.64

Microscopic changes in the liver, heart, and kidneys in alloxan diabetes rats

V.V. Kovpak, B.V. Borisevich, Yu.O. Kharkevych

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 08.08.2018
Received in revised form
04.09.2018
Accepted 05.09.2018

National University of Life and
Environmental Sciences of Ukraine,
Heroyiv Oborony st., 15, Kyiv,
03041, Ukraine.
Tel.: +38-067-935-25-70
E-mail: vtkovpak@ukr.net

Kovpak, V.V., Borisevich, B.V., & Kharkevych, Yu.O. (2018). Microscopic changes in the liver, heart, and kidneys in alloxan diabetes rats. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 20(88), 56–62. doi: 10.32718/nvlvet8810

To make future researches of the results of treatment of diabetes possible, it is necessary to create a model of this pathology in experimental animals. It is crucial to trace the correlation between changes in organs when this pathology occurs in clinical cases and when it occurs in experimental cases. Today we have a number of methods used to form alloxan diabetes in animals, but alloxan monohydrate is the most frequently used. Thus, the purpose of our study was to: study microscopic changes in the liver, heart, and kidneys of alloxan diabetes rats. The experimental model of diabetes was reproduced by a 150 mg/kg single-dose subcutaneous administration of alloxan monohydrate in the form of a 5% solution per citrate buffer (pH 4.5). To prove the development of diabetes, blood glucose levels were measured by a Rightest GM500 blood glucose meter on the 20th day after administration of alloxan. There were used animals with medium severity diabetes (fasting glucose test showings 10 to 20 mmol/l). The experimental animals were euthanized by ethereal anesthesia decapitation. Samples of the liver, heart, and kidneys for histological examination were taken on the 20th day after administration of alloxan. Histologic sections were prepared according to the standard method, coloring was made by hematoxylin and eosin and based on Van Gizon method. We have found that on the 20th day after the simulation of alloxan diabetes, the liver showed microscopic signs of hepatitis with dystrophic changes in hepatocytes and intracellular cholestasis. The kidneys showed destruction of all structural components of the glomeruli with subsequent necrosis and dystrophic changes and destruction of the epithelium of the curly and straight tubules. The heart showed granular degeneration of cardiocytes, in some areas, and distinct swelling between the muscle fibers bundles and inside the muscle fibers bundles, infiltration of the connective tissue stroma by erythrocytes in others. We believe that it is possible to obtain the most optimal spectrum of signs peculiar for type 1 diabetes by administration of alloxan as evidenced by microscopic changes in organs. Further, this model of diabetes will be used to study the influence of cell transplantation upon the development of the disease.

Key words: alloxan diabetes, alloxan, histology, heart, kidney, liver, rat.

Мікроскопічні зміни в печінці, серці і нирках щурів за алоксанового цукрового діабету

В.В. Ковпак, Б.В. Борисевич, Ю.О. Харкевич

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

З метою подальшого дослідження впливу лікування на перебіг цукрового діабету, необхідне створення моделі даної патології у дослідних тварин. Важливо прослідкувати відповідність змін у органах за даної патології при клінічних випадках та експериментальному формуванні. На даний час розроблено декілька методів формування експериментального цукрового діабету у тварин, проте найчастіше використовують введення алоксану моногідрату. Тому метою нашого дослідження було: дослідити мікроскопічні зміни в печінці, серці і нирках щурів за алоксанового цукрового діабету. Експериментальну модель цукрового діабету відтворювали шляхом одноразового підшкірного введення алоксану моногідрату в дозі 150 мг/кг у вигляді 5% розчину на цитратному буфері (рН 4,5). Для підтвердження розвитку цукрового діабету рівень глюкози крові визначали на 20 добу після введення алоксану за допомогою глюкометра Rightest GM500. В експерименті використовували тварин із цукровим діабетом середньої важкості (з

рівнем глюкози крові натще від 10 до 20 ммоль/л). Евтаназію дослідних тварин здійснювали шляхом декапітації під ефірним наркозом. Відбір проб печінки, серця та нирок для гістологічних досліджень здійснювали на 20-ту добу після введення алоксану. Підготовку гістозрізів проводили за стандартною методикою, фарбування проводили гематоксиліном і еозином та за методом Ван Гізон. У процесі дослідження нами встановлено, що у печінці на 20-ту добу після моделювання алоксанового цукрового діабету встановлюють мікроскопічні ознаки гепатиту, який супроводжується дистрофічними змінами гепатоцитів і внутрішньочасточковим застоєм жовчі. У нирках шурів відбувалось руйнування всіх структурних компонентів клубочків з наступним їх некрозом, а також дистрофічні зміни й руйнування епітелію звивистих і прямих канальців. У серці виявляли зернисту дистрофію кардіоцитів, в одних ділянках та виразний набряк між пучками м'язових волокон і всередині пучків м'язових волокон, інфільтрацію сполучнотканинної стромы еритроцитами у інших. На нашу думку найоптимальніший спектр ознак, характерних для цукрового діабету I типу, можливо отримати шляхом введення алоксану, що підтверджено мікроскопічними змінами у органах. У подальшому дана модель цукрового діабету використовуватиметься для вивчення впливу клітинної трансплантації на перебіг захворювання.

Ключові слова: експериментальний цукровий діабет, алоксан, гістологія, серце, нирки, печінка, шур.

Вступ

Цукровий діабет I типу (або інсулінозалежний ЦД) – хронічне ендокринно-обмінне захворювання, зумовлене абсолютною недостатністю інсуліну. У тварин цукровий діабет виникає в результаті численних причин, які порушують продукцію інсуліну, його транспортування або ж чутливість тканин до інсуліну (Graham et al., 1994; Buschard, 2011). Варто зазначити, що в останні роки відмічають позитивну динаміку щодо кількості тварин, хворих на цукровий діабет (Marmor et al., 1982; Panciera et al., 1990; Feldman et al., 1997; Goossens et al., 1998; Gupta et al., 2003; Prahl et al., 2007; Ohlund et al., 2015).

Початковим етапом у розвитку патологічних змін в органах при ЦД є пошкодження мембрани, викликане властивими діабету порушеннями: збільшена фільтрація через судинну стінку плазматичних білків і їх відкладення в ній, фізичне пошкодження основної мембрани, підвищення гідростатичного тиску (Prihozhan, 1981).

За даними Серова та ін., при ЦД відбувається ураження печінки. При діабеті зустрічається жирова інфільтрація печінки. Відомо, що депонування ліпідів в печінці при діабеті в більшості випадків починається у центрі часточок. Жирову інфільтрацію супроводжує характерна вакуолізація ядер гепатоцитів за рахунок скупчень в них глікогену. Зазвичай гепатоцити із світлою цитоплазмою і вакуолізованими ядрами у великій кількості розташовуються на периферії часточок, при електронно-мікроскопічному дослідженні внутрішньоядерний глікоген виявляється у вигляді скупчень зерен. При ЦД в окремих випадках можливий розвиток цирозу печінки (Prihozhan, 1981; Choudhury and Sanyal, 2004).

За даними Struble A.L., у тварин з ЦД спостерігається гіпертензія, частота виникнення якої корелює із тривалістю захворювання, а також у хворих на ЦД при системній гіпертензії підвищений ризик розвитку серцево-судинних захворювань (Struble et al., 1998).

При ЦД відмічаються зміни у судинах, особливо дрібних артерій та артеріол, у вигляді плазморагії, гіалінозу та проліферації ендотелію, які відображають прояв мікроангіопатії (Prihozhan, 1981).

У котів при ЦД відмічаються патологічні зміни у нирках (Goossens et al., 1998). Патогенез достеменно не відомий, але встановлено, що хронічна гіперглікемія сприяє розвитку хронічної інтрагломерулярної гіпертензії та гіперперфузії (Clark and Lee, 1995). Збільшення внутрішньоклубочкового тиску сприяє відк-

ладенню білка в мезангії. Спостерігається потовщення базальної мембрани ниркових клубочків і розширення мезангію, який проникає в субендотеліальний простір і просвіт клубочкових капілярів, викликаючи тим самим уповільнення кровотоку в ниркових клубочках і швидкості фільтрації. Результатом цих процесів є гломерулосклероз і ниркова недостатність (Unger et al., 1998).

З метою подальшого дослідження лікування на перебіг цукрового діабету необхідне створення моделі даної патології у дослідних тварин. Важливо прослідкувати відповідність змін у органах за даної патології при клінічних випадках та експериментальному формуванні.

На даний час розроблено декілька методів формування експериментального цукрового діабету у тварин (Rees and Alcolado, 2005; Masiello, 2006; Etuk, 2010), проте найчастіше використовують введення алоксану моногідрату.

Мета роботи: дослідити мікроскопічні зміни в печінці, серці і нирках шурів за алоксанового цукрового діабету. Завдання: 1. Сформувати експериментальну модель цукрового діабету у шурів; 2. Провести гістологічне дослідження органів (серце, печінка, нирки) на 20-ту добу після формування патології; 3. Аналіз отриманих результатів.

Матеріал та методи досліджень

Експерименти на тваринах були виконані відповідно до вимог “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, схвалених I Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна). В досліді використали 10 самок шурів віком 4–5 місяців із середньою вагою 230 г. Контрольна група тварин утримувалась в тих же умовах, що й тварини експериментальної групи. Експериментальну модель цукрового діабету відтворювали шляхом одноразового підшкірного введення алоксану моногідрату (Sigma, США) у дозі 150 мг/кг у вигляді 5% розчину на цитратному буфері (рН 4,5) після попередньої 24-годинної голодної дієти (за вільного доступу до води). Для зменшення загибелі тварин внаслідок гіпоглікемічного шоку шурі після індукції діабету замість води отримували 5% розчин глюкози (Zhyliuk et al., 2015).

Для підтвердження розвитку цукрового діабету рівень глюкози крові визначали на 20-ту добу після введення алоксану за допомогою глюкометра Rightest GM500 (Bionime, Швейцарія). Відбір крові для визначення рівня глюкози проводили зранку натщесерце

(розрив між годівлею та аналізом складав 12 годин). У щурів відбір крові для аналізу здійснювали з кінчика хвоста шляхом його проколу. Після введення алоксану у 15% тварин розвивався вкрай важкий стан із гіперглікемією вище ніж 30 ммоль/л, тому вони були виведені з експерименту на 5-ту добу. В експерименті використовували тварин із цукровим діабетом середньої важкості (з рівнем глюкози крові натще від 10 до 20 ммоль/л).

Відбір проб печінки, серця та нирок для гістологічних досліджень при визначенні змін у органах при алоксановому цукровому діабеті здійснювали на 20-ту добу після введення алоксану. Евтаназію дослідних тварин здійснювали шляхом декапітації під ефірним наркозом. Фіксацію відібраних зразків здійснювали протягом 7 діб, використовуючи 10% водний розчин нейтрального формаліну, об'єм якого у 20–40 разів перевищував об'єм відібраного матеріалу. З фіксованих зразків у місцях патологічного процесу крізь усю товщину тканини вирізали шматочки завтовшки 3–4 мм та закладали у спеціальні пластикові касети для подальшої гістологічної обробки.

Зневоднення фіксованих зразків здійснювали у автоматі для гістологічної обробки тканин карусельного типу STP – 120 (MICROM, Німеччина). Формування парафінових блоків здійснювали за допомогою станції заливання в парафін AP 280 (MICROM, Німеччина). Зрізи завтовшки 5–7 μ к виготовляли за допомогою ротаційного мікротома HM 320 E (MICROM, Німеччина) та системи переносу зрізів STS, (MICROM, Німеччина), звідки їх переносили на підготовлене предметне скло і залишали підсихати на ніч.

Депарафінізацію та фарбування зрізів гематоксиліном і еозином та здійснювали у автоматі для фарбування тканин лінійного типу HMS 70 (MICROM, Німеччина).

Результати та їх обговорення

При проведенні гістологічних досліджень печінки контрольної групи (без введення алоксану) щурів нами було встановлено, що ззовні вона вкрита відносно тонкою сполучнотканинною капсулою, від якої всередину органу відходять трабекули, які поділяють печінку на окремі часточки. Ці трабекули досить тонкі, тому межі часточок при зафарбовуванні гематоксиліном і еозином не завжди досить виразні. Печінкові часточки мають багатокутну форму, в їх центрі локалізується центральна вена.

Печінкові часточки побудовані з гепатоцитів – великих клітин з виразно еозинотильною цитоплазмою і досить великим базотильним ядром зазвичай округлої форми, в якому чітко диференціювались 1–3 ядра. Місцями в печінці реєструються гепатоцити, цитоплазма яких містить 2 ядра. Від центральної вени радіально розходяться печінкові балки, представлені більш-менш виразними рядами гепатоцитів. Між ендотеліоцитами внутрішньочасточкових капілярів розсіяні поодинокі клітини Купфера.

У міжчасточковій сполучній тканині по кутах часточок виявляються печінкові триади, що локалізуються в порталних трактах. Кожна така триада утворена міжчасточковими артерією, веною та жовчною протокою.

При проведенні гістологічних досліджень печінки щурів за експериментального алоксанового цукрового діабету нами було встановлено наявність у ній виразних мікроскопічних змін, які виявлялися в усіх структурних утвореннях органу.

Вся печінка була дифузно набрякла, що призводило до порушення впорядкованої структури (дезорганізації) печінкових балок внаслідок порушення зв'язків між окремими гепатоцитами. Центральні вени печінкових часточок були виразно розширені (рис. 1).

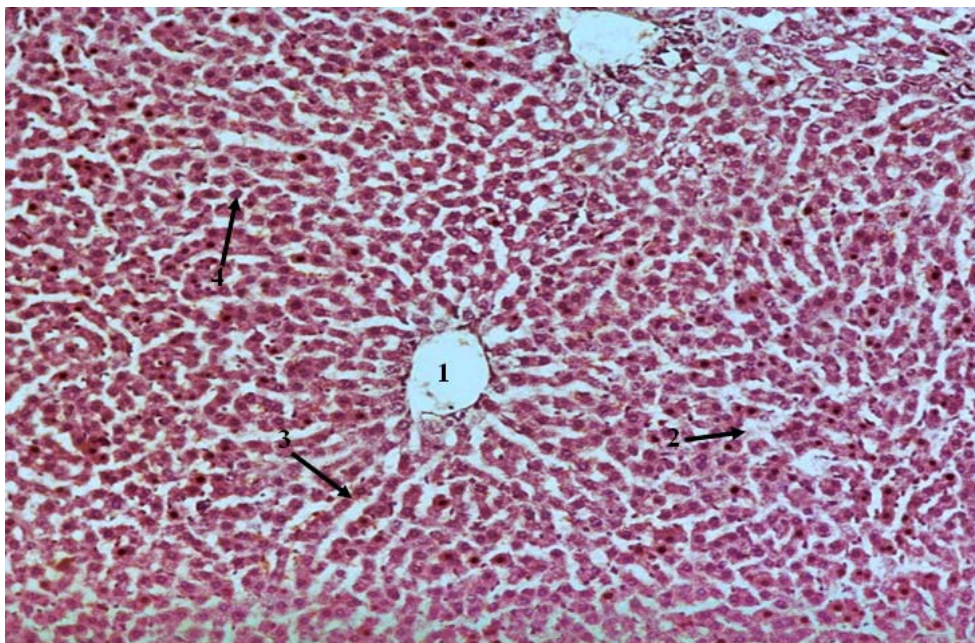


Рис. 1. Печінка щура за експериментального алоксанового цукрового діабету: 1 – центральна вена; 2 – набряк; 3 – печінкова балка; 4 – дезорганізація печінкових балок. Гематоксилін Караці та еозин, зб. $\times 50$

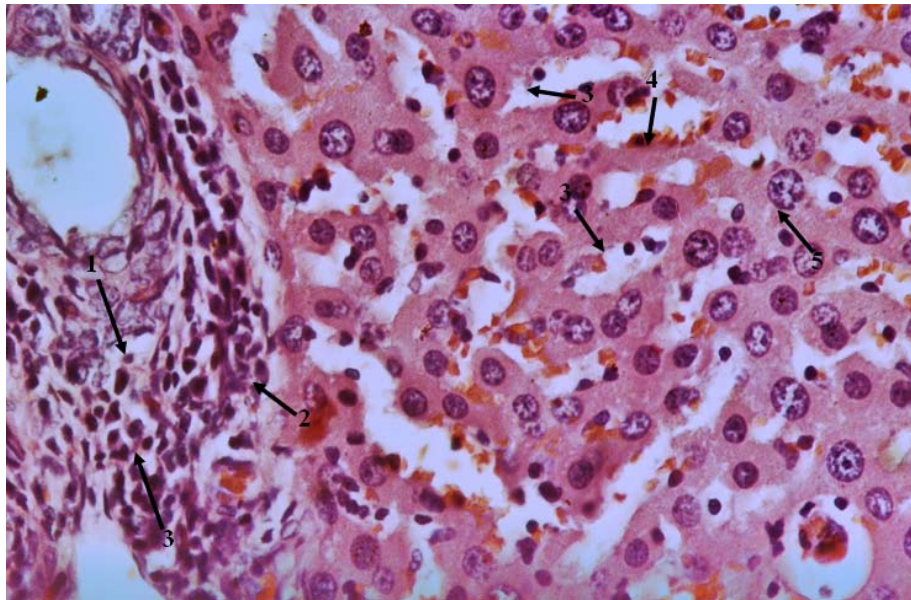


Рис. 2. Печінка щура за експериментального алоксанового цукрового діабету: 1 – набряк портального тракту; 2 – моноцит; 3 – лімфоцит; 4 – еритроцити; 5 – дисфункціональний набряк ядра. Гематоксилін Караці та еозин, зб. $\times 400$

У поодиноких гепатоцитах реєструвався дисфункціональний (токсичний) набряк ядра, який відповідно до сучасних уявлень розглядається як передвісник загибелі клітини (рис. 2 і 3).

У портальних трактах виявлялися помірний набряк і клітинна інфільтрація (переважно лімфоцитами та меншою кількістю моноцитів). Портальні вени були виразно розширені й переповнені клітинами крові. В їх просвіті реєструвалось склеювання еритроцитів. Жовчні протоки були розширені, клітини їх

епітелію перебували у стані зернистої дистрофії (рис. 3).

Ниркові тільця контрольної групи тварин мали округлу форму. Кожне ниркове тільце було побудоване зі сплетення артеріальних капілярів, яке утворювало клубочок, і оточуючої його капсули ниркового тільця. Остання була побудована з парієтального і вісцерального листків, вистелених простим плоским епітелієм. Між капілярним сплетінням ниркового тільця і його капсулою виявляли вузьку порожнину.

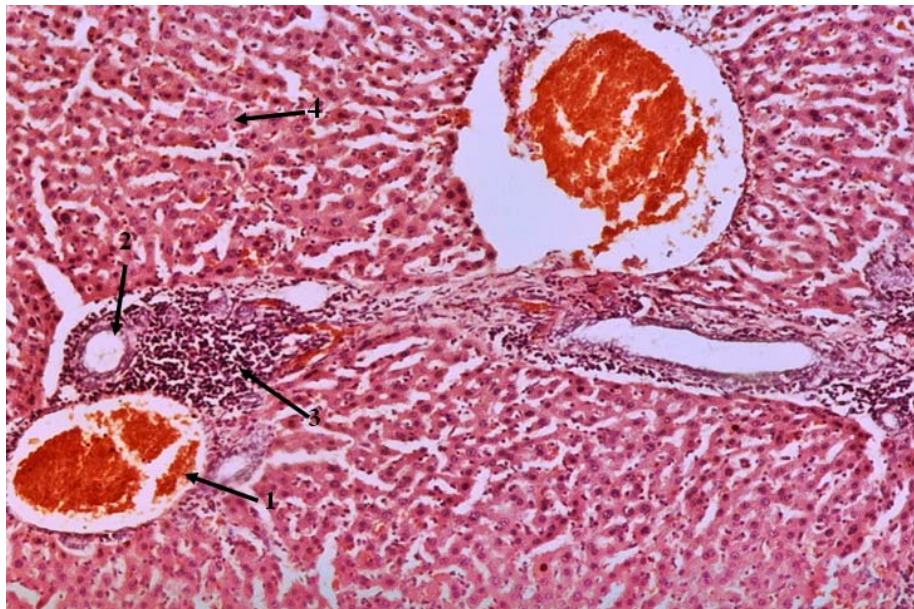


Рис. 3. Печінка щура за експериментального алоксанового цукрового діабету: 1 – розширена, переповнена кров'ю портальна вена; 2 – жовчна протока; 3 – клітинна інфільтрація портального тракту; 4 – зерниста дистрофія гепатоцитів. Гематоксилін Караці та еозин, зб. $\times 50$

Початкова частина звивистих каналців перебуває безпосередньо поблизу ниркового тільця у вигляді трубочок округлої форми, вистелених простим стовпчастим епітелієм. Кінцева частина звивистих канал-

ців без різких меж переходила у низхідне коліно петлі Генле, що опускається глибоко в мозкову речовину і переходила у висхідне коліно, яке, доходячи до кіркової речовини, знову переходить у звивисті каналці.

Звивисті каналці переходили у прямі ниркові каналці, які були розташовані в мозковій речовині нирок. Прямі каналці відкривалися отворами сосочкових проток у ниркову миску, вистелену перехідним епітелієм.

При проведенні гістологічних досліджень нирок щурів на 20-ту добу після моделювання алоксанового цукрового діабету нами було встановлено наявність виразних мікроскопічних змін і в цьому органі. Всі кровоносні судини строми були розширені, переповнені кров'ю (рис. 4).

У ниркових тільцях реєструвались два типи мікроскопічних змін. В частині ниркових тілець виявляли руйнування капілярів їх клубочків, руйнування мезангіоцитів та руйнування вісцерального листка капсули ниркового тільця (рис. 5). Усі ці зміни призводили до повної дезорганізації структури клубочків.

На нашу думку, описані зміни були початковою стадією патологічного процесу в ниркових тільцях за експериментального алоксанового цукрового діабету. В подальшому ж відбувався повний некроз клубочків, при якому в частині некротизованих клубочків виявлялися крововиливи (рис. 4).

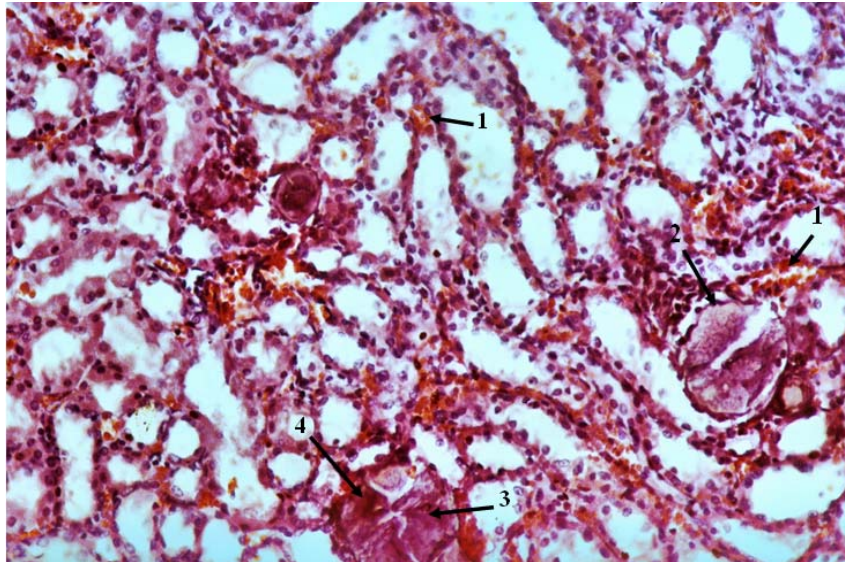


Рис. 4. Нирка щура за експериментального алоксанового цукрового діабету: 1 – розширений, переповнений кров'ю капіляр; 2 – парієтальний листок капсули ниркового тільця; 3 – некроз клубочка; 4 – крововилив у некротизованому клубочку. Гематоксилін Караці та еозин, зб. $\times 100$

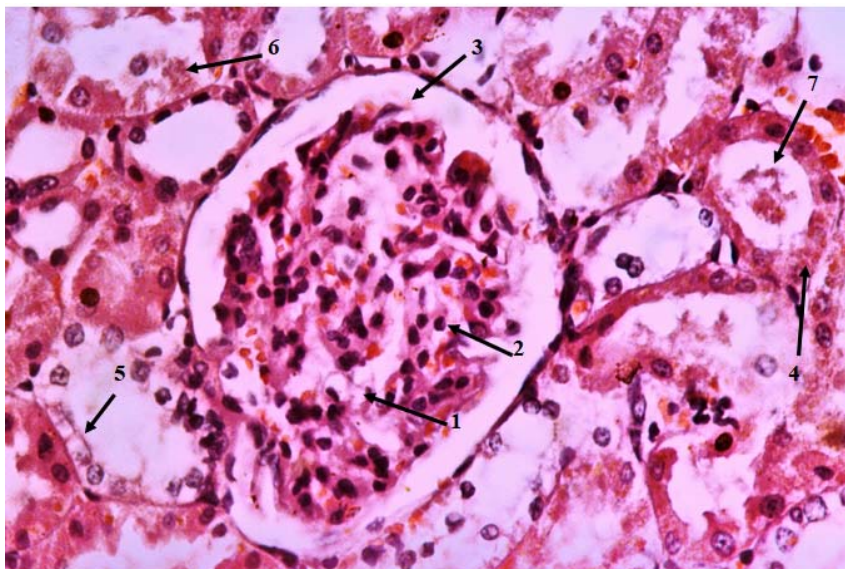


Рис. 5. Ниркове тільце щура за експериментального алоксанового цукрового діабету: 1 – руйнування капіляру клубочка; 2 – руйнування мезангіоцита; 3 – руйнування вісцерального листка капсули ниркового тільця; 4 – зерниста дистрофія клітин епітелію; 5 – гідропічна дистрофія клітин епітелію; 6 – руйнування клітин епітелію; 7 – білковий детрит у просвіті звивистого каналця. Гематоксилін Караці та еозин, зб. $\times 400$

Виразні мікроскопічні зміни також виявлялися в усіх відділах каналців нирок. У звивистих каналцях реєструвались зерниста й гідропічна дистрофії та

руйнування клітин їх епітелію. В просвіті багатьох каналців знаходився білковий детрит (рис. 5). Аналогічні зміни були встановлені і в прямих каналцях.

При проведенні гістологічних досліджень серця контрольної групи щурів встановлено, що його стінка побудована з трьох оболонок: ендокарду (внутрішній шар), міокарду (середній шар) і епікарду (зовнішній шар). Своєю чергою ендокард був побудований із чотирьох шарів: ендотеліального, підендотеліального, м'язово-еластичного і сполучнотканинного.

Міокард був сформований із поперечно-посмугованої серцевої м'язової тканини, яка утворена окремими волокнами. Волокна одне від одного відокремлювалися тонкими прошарками пухкої волокнистої сполучної тканини. Ці волокна анастомозували між собою, утворюючи тривимірну сітку. Волокна серцевого м'яза були згруповані в пучки, які відокремлювалися один від одного товстішими прошарками пухкої волокнистої сполучної тканини. В останній

проходили кровоносні судини.

Епікард вкривав зовнішню поверхню міокарду і був представлений тонкою пластинкою сполучної тканини, вкритою мезотелієм.

При проведенні гістологічних досліджень серця щурів на 20-ту добу після моделювання алоксанового цукрового діабету нами було встановлено наявність виразних мікроскопічних змін у міокарді. При цьому на різних ділянках серцевого м'язу мікроскопічні зміни були дещо різними. На одних ділянках реєструвалась лише зерниста дистрофія кардіоцитів (рис. 6 і 7).

На інших ділянках було встановлено виразний набряк між пучками м'язових волокон і всередині пучків м'язових волокон та інфільтрацію сполучнотканинної строми еритроцитами (рис. 7).

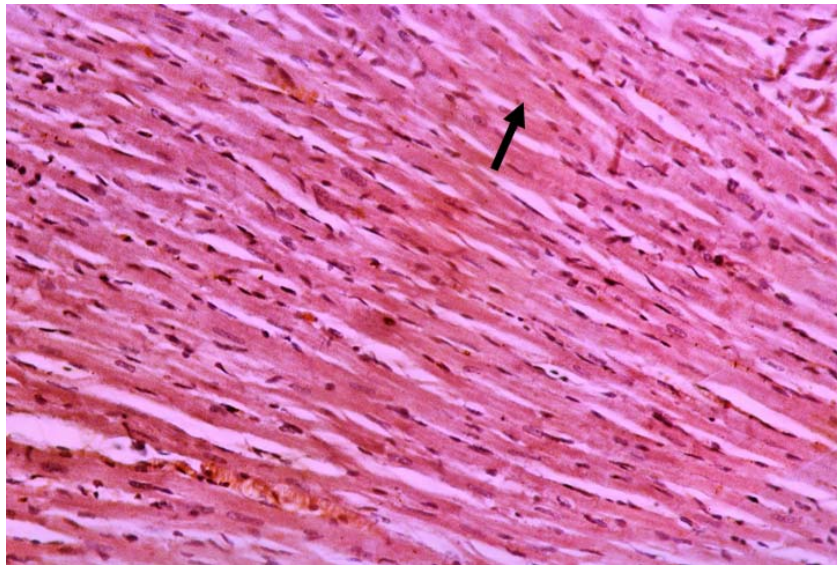


Рис. 6. Міокард щура за експериментального алоксанового цукрового діабету: зерниста дистрофія кардіоцитів (показано стрілкою). Гематоксилін Караці та еозин, зб. $\times 100$

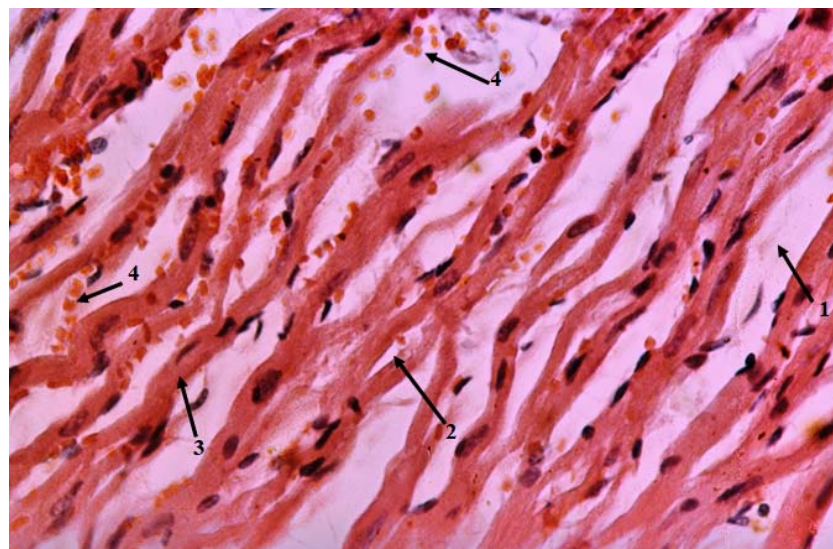


Рис. 7. Міокард щура за експериментального алоксанового цукрового діабету: 1 – набряк між пучками м'язових волокон; 2 – набряк всередині пучка м'язових волокон; 3 – відсутність посмугованості м'язового волокна; 4 – еритроцити. Гематоксилін Караці та еозин, зб. $\times 400$

Висновки

Таким чином, у печінці на 20-ту добу після моделювання алоксанового цукрового діабету встановлюють мікроскопічні ознаки гепатиту, який супроводжується дистрофічними змінами гепатоцитів і внутрішньочасточковим застоєм крові. У нирках шурів відбувалось руйнування всіх структурних компонентів клубочків з подальшим їх некрозом, а також дистрофічні зміни й руйнування епітелію звивистих і прямих каналців. У серці виявляли зерниста дистрофія кардіоцитів, в одних ділянках та виразний набряк між пучками м'язових волокон і всередині пучків м'язових волокон, інфільтрацію сполучнотканинної стромы еритроцитами у інших.

Перспективи подальших досліджень: на нашу думку, найоптимальніший спектр ознак, характерних для цукрового діабету I типу, можливо отримати шляхом введення алоксану, що підтверджено мікроскопічними змінами у органах. У подальшому дана модель цукрового діабету використовуватиметься для вивчення впливу клітинної трансплантації на перебіг захворювання.

References

- Buschard, K. (2011). What causes type 1 diabetes? Lessons from animal models. *APMIS*, 119 (132), 1–19. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02765.x.
- Graham, P.A., Maskell, I.E., & Nash, A.S. (1994). Canned high fiber diet and postprandial glycemia in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. *Journal of Nutrition*, 124, 2712–2715. doi: 10.1093/jn/124.suppl_12.2712S.
- Feldman, E.C., Nelson, R.W., & Feldman, M.S. (1997). Intensive 50-week evaluation of glipizide administration in 50 cats with previously untreated diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 210(6), 772–777. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9074678>.
- Goossens, M., Nelson, R.W., Feldman, E.C., & Griffey, S.M. (1998). Response to insulin treatment and survival in 104 cats with diabetes mellitus (1985–1995). *J. Vet. Intern. Med.*, 12(1), 1–6. doi: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb00489.x.
- Guptill, L., Glickman, L., & Glickman, N. (2003). Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records (1970–1999). *Vet J.*, 165(3), 240–247. doi: 10.1016/S1090-0233(02)00242-3.
- Marmor, M., Willeberg, P., Glickman, L.T., Priester, W.A., Cypess, R.H., & Hurvitz, A.I. (1982). Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 43(3), 465–470. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7073062>.
- Panciera, D.L., Thomas, C.B., Eicker, S.W., & Atkins, C.E. (1990). Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980–1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 197(11), 1504–1508. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2272886>.
- Ohlund, M., Fall, T., Ström Holst, B., Hansson-Hamlin, H., Bonnett, B., & Egenvall, A. (2015). Incidence of diabetes mellitus in insured swedish cats in relation to age, breed and sex. *J. Vet. Intern. Med.*, 5(29), 1342–1347. doi: 10.1111/jvim.13584.
- Prahl, A., Guptill, L., Glickman, N.W., Tetrack, M., & Glickman, L.T. (2007). Time trends and risk factors for diabetes mellitus in cats presented to veterinary teaching hospitals. *J. Feline Med. Surg.*, 9(5), 351–358. doi: 10.1016/j.jfms.2007.02.004.
- Prihozhan, V.M. (1981). Porazhenie nervnoj sistemy pri saharom diabete. 2-e izd., pererab. i dop. Moskva, Medicina (in Russian).
- Serov, V.V. & Lapshin, K. (1989). Morfologicheskaja diagnostika zabolevanij pecheni. Moskva, Medicina (in Russian).
- Choudhury, J., & Sanyal, A. J. (2004). Fatty liver: biochemical and clinical aspects. *Semin Liver Dis*, 24(4), 349–362. doi: 10.1055/s-2004-860864.
- Struble, A.L., Feldman, E.C., Nelson, R.W. & Kass, P.H. (1998). Systemic hypertension and proteinuria in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 213, 822–825. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743720>.
- Clark, C.M., & Lee, D.A. (1995). Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 332, 1210–1217. doi: 10.1056/NEJM199505043321807.
- Unger, R.H., Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M., & Larsen, P.R. (1998). Diabetes mellitus. Williams Textbook of Endocrinology. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Etuk, E.U. (2010). Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 1(2), 130–134. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.212.9006&rep=rep1&type=pdf>.
- Masiello, P. (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic b-cell mass. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(5–6), 873–893. doi: 10.1016/j.biocel.2005.09.007.
- Rees, D.A. & Alcolado, J.C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 22(4), 359–370. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x.
- Zhyliuk, V.I., Mamchur, V.Y., Petruk, N.S. & Lievykh, A.E. (2015). Analiz morfometrychnykh ta ultrastrukturnykh kharakterystyk hemomikrotsyrukliatornoho rusla hipokampu shchuriv z aloksanovym diabetom za umov vvedennia tsytykolinu. *Scientific Journal ScienceRise*, 12(7/4), 53–59. doi: 10.15587/2313-8416.2015.45937 (in Ukrainian).